

Stručni rad

POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA POPRAVAK DNA I OSJETLJIVOSTI NA IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE

Mirna MILIĆ¹, Ružica ROZGAJ¹, Vilena KAŠUBA¹, Dragan KUBELKA², Sabrina ANGELINI³
i Patrizia HRELIA³

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada¹, Državni zavod za radiološku i nuklearnu sigurnost², Zagreb,
Hrvatska, Department of Pharmacology, University of Bologna, Italija³*

Primljeno u svibnju 2010.
Prihvaćeno u kolovozu 2010.

Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti razinu oštećenja DNA u leukocitima periferne krvi prije, neposredno nakon i 120 min nakon ozračivanja dozom zračenja od 2 Gy te usporediti razine nastalih oštećenja između kontrolne skupine i skupine medicinskih radnika izloženih niskim dozama ionizirajućeg zračenja na svojim radnim mjestima. Istražen je utjecaj polimorfizma u genima koji sudjeluju u popravku DNA; **hOGG1*, *XRCC1* i *MGMT* na razinu izmjerenih oštećenja. Istraživanjem je obuhvaćeno 40 zdravih ispitanika obaju spolova (20 kontrola i 20 izloženih). Razina oštećenja DNA mjerena je komet-testom u alkalnim uvjetima, pri čemu su za svakog ispitanika i svaku vremensku točku analizirane vrijednosti dužine repa, % DNA u repu i repnog momenta kometa. Rezultati pokazuju da su vrijednosti % DNA u repu i repni moment kometa bili statistički značajno viši u izloženoj populaciji prije, neposredno nakon i 120 min nakon ozračivanja. Pokazano je da nosioci polimorfnih alela ovih gena u izloženoj skupini imaju statistički značajno više razine oštećenja DNA, kako naspram homozigota pripadne skupine, tako i naspram cijele kontrolne skupine te da početno oštećenje DNA značajno negativno korelira s ukupnom dozom zračenja koju su primili tijekom radnog vijeka. Dobiveni rezultati upućuju na vrijednost kombiniranja alkalnoga komet-testa i genotipizacije izloženih pojedinaca u genima za popravak DNA, što bi moglo pridonijeti prepoznavanju subpopulacija sklonijih nakupljanju oštećenja DNA, a time i sklonijih riziku od razvoja tumorskih bolesti.

KLJUČNE RIJEČI: *geni hOGG1, XRCC1 i MGMT, genotipizacija, izloženost ionizirajućem zračenju, komet-test, oštećenja i popravak DNA*

Čovjek je u svojim životnim i radnim aktivnostima neprestano izložen različitim okolišnim i endogenim

genotoksičnim agensima. Biološke su posljedice takve izloženosti nakupljanje raznih mutacija i oštećenja u molekuli DNA koje mogu dovesti do poremećaja u funkciji genskog materijala. Gubitak normalne funkcije stanica može izazvati staničnu smrt ili rezultirati pojavom različitih zdravstvenih poremećaja, pa i teratogenim ili kancerogenim učincima (1).

Ionizirajuće zračenje dokazani je genotoksični agens (1). Izloženost zračenju može dovesti do stvaranja oksidativnih oštećenja, modifikacije baza i šećera u DNA, stvaranja apurinskih ili apirimidinskih mjesta, jednolančanih i dvolančanih lomova, stvaranja adukata, unutarlančanih i međulančanih ukriženih povezivanja u molekuli DNA i pojave drugih oštećenja (2). Ako primljena doza zračenja nije dovoljno

* POPIS KRATICA

hOGG1 - ljudska 8-oksogvanin glikozilaza
XRCC1 - engl. X-ray repair cross-complementing protein-group 1
MGMT - metil-gvanin DNA metil-transferaza
BER - engl. base excision repair, popravak isijecanjem baza
NER - engl. nucleotide excision repair, popravak isijecanjem nukleotida
HR - engl. homologous recombination, popravak homolognom rekombinacijom
NHEJ - engl. non-homologous end joining, sparivanje nehomolognih krajeva kromosoma
SNP - engl. single nucleotide polymorphism, promjena samo jednog nukleotida ili polimorfni homozigot
WT - divlji tip homozigot
HE - heterozigot
TL - engl. tail length, dužina repa, u mikrometrima
TI - engl. tail intensity, intenzitet repa
TM - engl. tail moment, repni moment
RFLP - engl. restriction fragment length polymorphism, određivanje polimorfizama na temelju različite dužine sljedova DNA nakon cijepanja restriktivskim enzimom
PCR - engl. polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom

visoka da izazove potpuno remećenje funkcija u stanici ili staničnu smrt, stanica će pokrenuti različite mehanizme popravka nastalih oštećenja, ovisno o tome jesu li lomovi DNA jednolančani (popravljaju se isijecanjem baza ili BER, od engl. *base excision repair* i isijecanjem nukleotida ili NER, od engl. *nucleotide excision repair*) ili dvolančani (popravljaju se mehanizmom homologne rekombinacije ili HR, od engl. *homologous recombination* te nehomolognim spajanjem krajeva ili NHEJ, od engl. *non-homologous end joining*). Promijenjeni kapacitet popravka može dovesti do nakupljanja mutacija u molekuli DNA, genomske nestabilnosti te povećanog rizika od stvaranja tumora (3).

Utjecaj zračenja na DNA i odgovor pojedinaca nije uniforman. Zapaženo je postojanje individualnih razlika u količini oštećenja DNA nastalih neposredno nakon zračenja te u njihovu popravku. Popravak nastalih oštećenja korelira s radioosjetljivošću i ima značajan utjecaj u zaštiti od zračenja i radioterapiji (4).

Sa stajališta zaštite od zračenja, posebno su zanimljive izložene populacije koje su na svojim radnim mjestima svakodnevno izložene niskim dozama zračenja iz otvorenih i/ili zatvorenih izvora. Brojna istraživanja upućuju na pojavu kromosomskih oštećenja pri kroničnoj izloženosti niskim dozama zračenja, ali bez potvrđene povezanosti između primljene doze i nastalih oštećenja (5-11). Novija istraživanja, koja su na radno izloženoj skupini ispitanika proveli Andreassi i sur. (12) potvrđuju da je utjecaj individualne predispozicije u staničnom odgovoru na zračenje značajniji od utjecaja vremenske izloženosti (mjerene godinama radnog staža) (13). Varijacije mogu biti rezultat promjena u ekspresiji gena, ili rezultat polimorfizama gena uključenih u različite mehanizme popravka. Polimorfizam obično uključuje gubitak (deleciju) manjeg ili većeg dijela slijeda u molekuli DNA, umetanje određenog broja nukleotida ili višestrukog ponavljanja di-, tri- ili oligonukleotida (što varira među pojedincima), ili promjenu samo jednog nukleotida (tzv. SNP, od engl. *single nucleotide polymorphism*). SNP je polimorfizam jednog nukleotida u kojem je jedan od njih četiri (A, T, C ili G) zamijenjen drugim nukleotidom. Polimorfizmi mogu dovesti do promijenjene (smanjene ili povećane) ekspresije određenog ili određenih gena, utječući na mehanizme popravka u stanici (14-18). Poznato je oko 130 gena koji sudjeluju u raznim mehanizmima popravka. Među njima, 80 gena sadržava više od 400 SNP-ova (19).

Novija istraživanja dovode polimorfizme određenih gena uključenih u različite mehanizme popravka ili metaboliziranja tvari u vezu s nastankom, razvojem i povećanom sklonosti prema nastanku nekih bolesti (20). Više studija izvijestilo je o povezanosti između izloženosti ionizirajućem zračenju i SNP-ova u genima za popravak (21-24).

U često proučavane gene ubraja se *XRCC1* (od engl. *X-ray cross complementing gene 1*). Njegov protein uključen je u BER popravak gdje djeluje usklađeno s OGG1 glikozilazom, poli(ADP-riboza) polimerazom (PARP), DNA ligazom III te DNA polimerazom β na spajanju DNA lomova ostalih nakon BER-a (25). Najčešći polimorfizam gena *XRCC1* je *XRCC1 Gln399* koji se spominje kao čimbenik rizika od pojave pojedinih vrsta tumora (26-29), primjerice raka glave i vrata (30), mokraćnog mjehura (31), pluća (32) i glioma (33).

Zanimljiv je i gen *hOGG1*, koji kodira za glikozilazu odgovornu za uklanjanje 8-OHdG oštećenja u molekuli DNA. Smješten je na p-kraku kromosoma 3, a dokazano je da gubitak heterozigotnosti toga gena prethodi ranim fazama razvoja raka pluća (34, 35). Literaturni podaci upućuju da je prisutnost polimorfnog heterozigota gena *hOGG1* povezana s rizikom od razvoja adenokarcinoma pluća (36, 37).

U popravku oštećenja nastalih alkilirajućim agensima važna je i O⁶ metil-gvanin alkilna transferaza (MGMT), koja je odgovorna za uklanjanje metilne skupine na O⁶- položaju u gvaninu (38). Polimorfizmi gena *MGMT* povezuju se s povećanim rizikom od pojave raka pluća (39-43).

Za otkrivanje oštećenja i popravka molekule DNA na razini pojedinačnih stanica u uvjetima *in vitro* i *in vivo* nakon izloženosti raznim genotoksičnim agensima, kemikalijama, ionizirajućem i neionizirajućem zračenju (44, 45) uspješno se primjenjuje metoda komet-testa (46). Ovaj test omogućuje otkrivanje jednolančanih i/ili dvolančanih lomova, ukriženog povezivanja lanaca te oštećenja baza u molekuli DNA. Obrisi neoštećene stanične DNA promatran pod fluorescencijskim mikroskopom nakon denaturacije, elektroforeze i bojenja okrugla je oblika, dok obrisi oštećenih DNA slične kometima, po čemu je metoda dobila ime. Najčešći pokazatelji oštećenja DNA su dužina repa kometa (TL - od engl. *tail length*), postotak DNA u repu (TI - od engl. *tail intensity*) i repni moment (TM - od engl. *tail moment*). Dužina repa predstavlja udaljenost na koju su fragmenti DNA otputovali iz jezgre. Najčešće se mjeri od središta jezgre, a izražava u mikrometrima. Proporcionalna je

oštećenju DNA i dužini odlomljenih fragmenata (47, 48). Metoda komet-testa uspješno se primjenjuje i u istraživanju učinkovitosti popravka DNA oštećene pod utjecajem nekoga genotoksičnog agensa. U te svrhe izložene se stanice inkubiraju na 37 °C te se u određenim vremenskim razmacima uzimaju uzorci za analizu na kojima se mjeri razina preostalog oštećenja (48).

Za potrebe ovog istraživanja izabrane su dvije skupine ispitanika: (1) medicinsko osoblje koje je na svojim radnim mjestima stalno izloženo niskim dozama ionizirajućeg zračenja te (2) odgovarajuća kontrolna skupina. Cilj istraživanja bio je utvrditi postoji li razlika u razini početnog oštećenja nastalog u DNA leukocita periferne krvi neposredno nakon izlaganja zračenju od 2 Gy te 120 min nakon izlaganja, kao i procijeniti na koji je način status polimorfnosti gena koji sudjeluju u popravku DNA povezan s kinetikom nastajanja i popravkom nastalih oštećenja.

ISPITANICI I METODE

Ispitanici

Istraživana populacija obuhvaća 40 zdravih ispitanika obaju spolova (20 izloženih i 20 kontrolnih) koji su dobrovoljno pristali na uzorkovanje venske krvi. Ispitanici su bili upoznati sa svrhom istraživanja te su im objašnjena načela primjenjivanih metoda. Cjelokupna organizacija istraživanja, komunikacija s ispitanicima, uzorkovanje krvi, postupci pri rukovanju uzorcima krvi u laboratorijskim uvjetima te postupanje s dobivenim rezultatima provedeni su u skladu s etičkim načelima i smjernicama pretpostavljenim za biomonitoring ljudskih populacija (49). Svi su ispitanici potpisali i informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju, a za njegovo je provođenje dobivena i suglasnost etičkog povjerenstva (IMI, Zagreb).

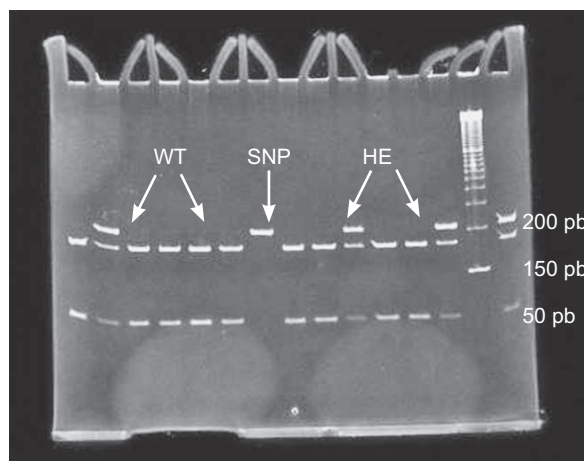
Izloženu skupinu čini 20 zdravstvenih radnika nepušača različitih zanimanja: gastroenterolog (N=2), kardiolog (N=3), kirurg (N=5), inženjer medicinske radiologije (N=8), medicinske sestre instrumentarke (N=2), koji su na svom radnom mjestu izloženi niskim dozama γ -zračenja. Izloženost zračenju redovito se nadzire filmskim dozimetrima, a u svih je ispitanika primljena doza zračenja bila u dopuštenim granicama (manje od 20 mSv na godinu).

Kontrolnu skupinu čine zdravi ispitanici koji na svojim radnim mjestima nisu izloženi ionizirajućem zračenju ni kemijskim mutagenima, a odgovarali su po dobi, spolu i pušenju izloženoj skupini.

Svi su ispitanici ispunili posebni standardizirani anketni upitnik s pomoću kojeg su prikupljene detaljne informacije o zdravstvenom stanju, navici pušenja, konzumiranju alkohola, uzimanju lijekova i dijagnostičkom izlaganju zračenju i/ili ultrazvuku te cijepljenju. U obzir nisu uzeti ispitanici koji boluju od kroničnih bolesti te oni koji su prethodnih mjeseci imali bilo kakve akutne infekcije i medicinske izloženosti koje bi mogle utjecati na vrijednosti nalaza.

Uzimanje uzoraka krvi

Ispitanici su podvrgnuti minimalno invazivnom zahvatu vađenja venske krvi iz kubitalne vene u sterilne spremnike (Becton Dickinson, SAD). Krv za komet-test (2 mL) pohranjena je u sterilne heparinizirane spremnike te držana u hladnjaku do obrade, dok su uzorci namijenjeni za izolaciju DNA (5 mL) pohranjeni u spremnik s EDTA (etilendiamintetraocetna kiselina) i držani na temperaturi od -20 °C.



Slika 1 Slika gela dobivenog elektroforetskim razdvajanjem odsječaka gena XRCC1 nakon bojenja etidij bromidom. Strelice označavaju mjesta na kojima su u gelu razdvojeni odsječci prisutni u homozigotu divljeg tipa (WT - od engl. wild type - duljina odsječaka 161 pb i 53 pb), heterozigotu (HE - duljina odsječaka 214 pb, 161 pb i 53 pb) i polimorfnom homozigotu (SNP - nepocijepan, duljina odsječaka 214 pb)

Komet-test

Primijenjena je alkalna izvedba komet-testa (50) s malim modifikacijama. Za svakog je ispitanika priređeno šest mikrogelova agaroze u koje su uklopljeni uzorci pune krvi (8 μ L). Dva su preparata služila kao negativna kontrola, dok su preostali ozračivani kao negativna kontrola, dok su preostali ozračivani gama-zračenjem. Mikrogelovi su nakon ozračivanja obrađeni standardnim postupkom, koji uključuje lizu (pH=10), denaturaciju (pH=13) u trajanju od 20 min

i elektroforezu na 300 mA i 25 V sljedećih 20 min. Uzorci su isprani u neutralizacijskom Tris-HCl puferu ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$, pH=7,5) tri puta po 5 min te potom obojeni etidij-bromidom ($20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma). Stakalca pokrivena predmetnicom spremljena su u tamne spremnike zasićene vlagom na $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ do analize. Analiza je provedena s pomoću fluorescentnog mikroskopa s ekscitacijskim filtrom od 515 nm do 560 nm (Zeiss, Njemačka), uz povećanje 250x. Mikroskop je putem CCD crno-bijele kamere povezan s računalnim sustavom za analizu slike (Comet Assay II, Perceptive Instruments Ltd., UK). Mjereni su sljedeći parametri: dužina repa (TL, u mikrometrima), intenzitet repa (TI) te repni moment (TM). Analizirano je 100 kometa po preparatu (ukupno 200 kometa po pojedinom ispitniku u svakoj istraživanoj vremenskoj točki).

Ozračivanje uzoraka

Unaprijed pripremljeni mikrogelovi s uzorcima krvi ozračeni su s pomoću uređaja Alcyon (CGR-MeV, Francuska) smještenog na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, koji sadržava izotop kobalta ^{60}Co . Uzorci su zračeni dozom od 2 Gy, što je postignuto njihovim držanjem 80 cm od izvora. Doza od 2 Gy odabrana je kao standardna dnevna doza u radioterapiji (51). Za jednolično ozračivanje rabljen je tzv. fantom izrađen od pleksistakla (PMMA-poli-metil-meta-akrilat), veličine $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$, u kojem su uzorci postavljeni u obliku sendviča između dvije ploče od pleksistakla. Polje zračenja bilo je $15 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$.

Praćenje popravka DNA

Ozračeni mikrogelovi s uzorcima krvi na kojima je praćen popravak DNA neposredno nakon ozračivanja prebačeni su u hranjivi medij RPMI 1640 bez seruma (Gibco, Škotska) te inkubirani na $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ do isteka 120. minute. Izabrani vremenski period odredili smo prema podacima drugih autora o kinetici popravka DNA koja se može zamijetiti od prvih minuta do nekoliko sati (2 h) nakon izloženosti zračenju niskog LET-a (50, 52-54). Nakon 120 min preparati su uloženi u hladnu otopinu za lizu, a daljnji koraci metode komet-testa provedeni su prema standardnom protokolu (50).

Izolacija DNA

Genomska DNA izolirana je iz limfocita periferne krvi modificiranim protokolom koji su predložili Daly i sur. (55). Svi upotrijebljeni reagensi nabavljeni su od proizvođača Sigma (SAD). DNA je dodatno pročišćena centrifugiranjem ($2 \times 5 \text{ min}$ na 5000 rpm)

na $4 \text{ } ^\circ\text{C}$, uz dodatak $500 \text{ } \mu\text{L}$ 70 %-tnog etanola. Tako pročišćen talog DNA ostavljen je na sušenju preko noći na sobnoj temperaturi. Sljedećeg dana talog je otopljen u $100 \text{ } \mu\text{L}$ TE pufera (10 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH=7,4; 1 mmol L^{-1} EDTA, pH=8,0). Čistoća i koncentracija DNA određene su spektrofotometrijskom metodom (NanoDrop ND-1000 spektrofotometar, NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, SAD), uzorci su razrijeđeni do koncentracije od $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ i spremljeni na $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$ do početka amplifikacije.

Nakon izolacije DNA, pristupilo se određivanju polimorfizma gena koji sudjeluju u popravku isijecanjem baza (BER): *hOGG1* (ljudska 8-oksogvanin glikozilaza, Ser326Cys), *XRCC1* (od engl. *X-ray repair cross-complementing protein-group 1*, Arg-194Trp) te u popravku nehomolognih krajeva (DRR od engl. *direct reversal repair*) i *MGMT* (metil-gvanin DNA metiltransferaza, Leu84Phe).

Lančana reakcija polimerazom uz određivanje polimorfizama na temelju različite dužine sljedova DNA nakon cijepanja restriksijskim enzimom ili PCR-RFLP (od engl. polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism)

10 ng genomske DNA amplificirano je u reakcijskoj (hibridizacijskoj) smjesi, ukupnog volumena od $10 \text{ } \mu\text{L}$. Smjesa se sastojala od 20 mmol L^{-1} Tris-HCl, 50 mmol L^{-1} KCl, $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ MgCl_2 , $0,11 \text{ mmol L}^{-1}$ svakog nukleotida dNTP, $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ svake početnice (označene kao forward-F i reverse-R) i $0,03 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ Platinum Taq DNA polimeraze (Invitrogen, Paisley, UK). Svaki uzorak za umnožavanje određenih sljedova analiziranih gena sastojao se od $9 \text{ } \mu\text{L}$ smjese za hibridizaciju te $1 \text{ } \mu\text{L}$ uzorka DNA.

Lančana reakcija polimerazom (PCR) provedena je prema sljedećem postupku: (I) inkubacija na $94 \text{ } ^\circ\text{C}$ (2 min) radi aktiviranja Taq DNA polimeraze; (II) inkubacija na $94 \text{ } ^\circ\text{C}$ (30 s) pri čemu se zbiva denaturacija dvolančane DNA; (III) inkubacija na temperaturi ovisnoj o istraživanom genu (30 s), pri čemu se odvija vezivanje početnice ili hibridizacija (tablica 1); (IV) inkubacija na $72 \text{ } ^\circ\text{C}$ (30 s) za vrijeme koje se zbiva sinteza ili produljivanje DNA. Koraci II do IV ponavljaju se 34 puta. Zatim slijedi (V) inkubacija na $72 \text{ } ^\circ\text{C}$ (5 min) i (VI) inkubacija na $10 \text{ } ^\circ\text{C}$. Nakon završetka ciklusa u reakcijskoj smjesi nalazi se velik broj kratkih odsječaka umnožene DNA.

Odsječci dobiveni PCR-om pocijepani su odgovarajućim restriksijskim endonukleazama (Fermentas, Vilnius, Litva) koje su prepoznavale i cijepale određeni slijed u DNA. Ako je gen polimorfan,

u njemu će postojati restrikcijsko mjesto koje enzim prepoznaje i tu cijepa DNA. Takvo mjesto imaju polimorfni homozigoti i svi heterozigoti za promatrani gen. Ako je promatrani gen prisutan u homozigotnoj formi divljeg tipa, on nema odgovarajuće restrikcijsko mjesto pa se cijepanje u tom slučaju ne događa. Na tablici 2 navedeni su enzimi, vrijeme i temperatura djelovanja, slijed koji cijepa određeni enzim te duljina odsječaka koji nastaju nakon takvog cijepanja. Cijepanje je bilo provođeno na 37 °C najmanje 3 sata.

Enzimski obrađeni produkti PCR-a analizirani su na 10 %-tnom poliakrilamidnom gelu (Bio-Rad, Hercules, SAD). Gelovi su postavljeni vertikalno u TE puferu (10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH=7,4; 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH=8). U jednu od jažica nanoseno je 0,8 µL biljega (daje signal svakih 50 pb). U ostale jažice nanoseno je po 6 µL uzorka. Elektroforeza je trajala 30 minuta, na 200 V, a gelovi su obojeni etidij-bromidom radi vizualizacije i određivanja genotipova. Rezultati genotipizacije potvrđeni su nasumičnim odabiranjem uzoraka koji su ponovno analizirani na poliakrilamidnom gelu ili alelnom diskriminacijom Taqmanovim probama s pomoću uređaja Real-Time PCR-a ABI Prism 7300 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, SAD).

Tablica 1 *Sastavnice za Real Time PCR*

Sastavnica	Volumen / µL
TaqMan Master Mix	6,5
Redestilirana H ₂ O	5,33
Početnice specifične za gen (F+R)	0,65
Uzorak DNA	0,5

Genotipizacija Taqmanovim probama u Real-Time PCR-u

Genotipizacija za praćenje polimorfizma u genu MGMT C/T napravljena je s pomoću posebno obilježenih proba za taj gen.

Amplifikacija uzoraka u ploči s 96 jažica provedena je na uređaju 7300 ABI Prism Real-Time PCR (Real-Time PCR-a ABI Prism 7300 thermocycler, Applied Biosystems, Foster City, SAD). Uzorcima DNA dodane su fluorescentno obilježene probe specifične za pojedini gen i polimorfizam te smjesa potrebna za umnožavanje fragmenata DNA (TaqMan allelic discrimination assay; Applera, Foster City, SAD) (tablica 2). Alelna diskriminacija određena je s pomoću računalne analize (Applied Biosystems, Foster City, SAD).

Ciklusi Real Time PCR-a zbirali su se u tri faze: 95 °C (10 min); 92 °C (15 s) te 60 °C (10 min). Za

Tablica 2 *Detaljan opis gena, izgled početnice, metoda dokazivanja polimorfizma, temperature za spajanje početnica te naziv restrikcijskog enzima i odsječaka DNA koji nastaju nakon njegova cijepanja*

Gen	rs	Metoda	Slijed za početnice	Temp. hibr.	Restrikcijski enzim
XRCC1 ex10	rs861539 [aCg > aTg; Thr241Met]	RFLP (57)	F GCC CCT CAG ATC ACA CCT AAC R CAT TGC CCA GCA CAG GAT AA	61 °C	MspI (37 °C, preko noći) C*CGG GGC*C WT-161, 53 pb HE-241, 161, 53 pb SNP-214 pb
hOGG1 ex4	rs1052133 [tCc > tGc; Ser326cys]	RFLP (58)	F CCCAACCCCAGTGGAT TCTCATTGC R GGTGCCCATCTAGCC TTGCGGCCCTT	60 °C	SatI/ Fnu4HI (37 °C, preko noći) GC*NGC CGN*CG WT-214,20 pb; HE-214,165,49,20 pb; SNP-165,49,20 pb
MGMT C/T*		RT TaqMan assay	-	-	-

rs – jedinstveni numerički kôd po kojem se prepoznaje određeni polimorfizam u određenom eksonu (ex) i položaj u promatranom genu

* - primijenjena je genotipizacija Taqmanovim probama u Real-Time PCR-u

razdvajanje dviju signalnih boja (VIC i FAM) bilo je dovoljno 40 ciklusa. VIC i FAM su fluorescentne boje čiji se intenzitet mjeri u analiziranim uzorcima te se na osnovi prisutnosti prevladavajućeg udjela pojedinog od tih obilježivača procjenjuje je li u analiziranom uzorku prisutan gen u obliku divljeg tipa ili polimornog homozigota, odnosno heterozigota (Slika 1) (56).

Statistička obrada podataka

U statističkoj analizi upotrijebljen je program STATISTICA 9 (StatSoft, Tulsa, SAD). Za usporedbu izložene i kontrolne skupine te za međusobnu usporedbu podskupina primijenjen je neparametrijski Mann-Whitney U-test. Radi normalizacije podataka rezultati su prije analize logaritmirani. Za procjenu utjecaja svih promatranih parametara na oštećenje i popravak DNA rabila se Spearmanova korelacija. Nositelji jednog ili obaju polimornih alela svrstani su zajedno, radi istraživanja utjecaja pojave polimornosti gena na razine oštećenja izmjerene u DNA.

REZULTATI

Opis istraživanih populacija s podacima o statusu homozigotnosti ili heterozigotnosti za pojedine gene prikazan je na tablici 3. Zbirni rezultati komet-testa na leukocitima periferne krvi ispitanika izložene i neizložene populacije prije zračenja prikazani su na tablici 4; neposredno nakon zračenja dozom od 2 Gy na tablici 5 te 120 min nakon zračenja dozom od 2 Gy na tablici 6. Za svaki od tri promatrana parametra komet-testa: dužinu repa (TL), intenzitet repa (% DNA, TI) i repni moment (TM) navedene su pripadne srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom,

medijan te minimum i maksimum pojedinačnih izmjerenih kometa.

Utvrđeno je da su vrijednosti % DNA u repu te repni moment kometa, izmjereni u sve tri vremenske točke (prije, neposredno nakon i 120 min nakon zračenja), bili statistički značajno povišeni u izloženoj populaciji (tablice 4-6). Takvi rezultati govore u prilog nastanku veće količine odlomljenih odsječaka DNA, koji pridonose porastu % DNA u repu kometa, što posljedično dovodi i do porasta repnog momenta. Zanimljivo je da je dužina repa kometa izmjerena u kontrolne populacije prije i neposredno nakon zračenja bila statistički značajno viša nego u izložene populacije, što upućuje na nastanak kratkih odlomljenih odsječaka DNA koji tijekom elektroforeze putuju na veću udaljenost od jezgre.

Rezultati korelacijske analize upućuju na statistički značajan pozitivan odnos polimornih gena *XRCC1* i *hOGG1* s razinom oštećenja izmjerenih u DNA neposredno nakon zračenja. U toj su vremenskoj točki zabilježene statistički značajne pozitivne korelacije između polimornog *XRCC1* s vrijednostima TL ($R=0,36$; $p=0,02$), TI ($R=0,32$, $p=0,04$) i TM ($R=0,35$, $p=0,03$). Za polimorni *hOGG1* zabilježene su statistički značajne pozitivne korelacije s vrijednostima TI ($R=0,39$, $p=0,01$) i TM ($R=0,38$, $p=0,01$). U vremenskoj točki 120 min nakon zračenja zabilježena je statistički značajna pozitivna korelacija polimornoga gena *MGMT C/T* s vrijednostima TI ($R=0,34$, $p=0,03$) i TM ($R=0,35$, $p=0,02$).

Iz podataka prikazanih na tablicama 4-6 vidljivo je da su nakon grupiranja prema statusu polimorfizma promatranih gena do izražaja došle razlike u osjetljivosti DNA na zračenje između skupina. Homozigoti za gen *XRCC1* u kontrolnoj populaciji imali su značajno veća oštećenja DNA nakon izlaganja zračenju, kako neposredno nakon zračenja tako i nakon 120 min

Tablica 3 Opis istraživanih populacija s podacima o statusu homozigotnosti ili heterozigotnosti za pojedine gene

Parametar	Izloženi	Kontrola
Broj ispitanika	20	20
Broj žena/broj muškaraca	9/11	8/12
Dob/godine (raspon)	41,40±9,62 (25 do 60)	41,40±9,76 (25 do 60)
Trajanje izloženosti/godine (raspon)	12,13±7,14 (1 do 28)	-
<i>XRCC1</i> Homozigoti/heterozigoti	5/15	6/14
<i>hOGG1</i> Homozigoti /heterozigoti	10/10	13/7
<i>MGMT C/T</i> homozigoti/heterozigoti	10/10	12/8

Tablica 4 Prikaz srednjih vrijednosti sa standardnom devijacijom (S.V.±SD), medijanom (med), minimumom i maksimumom (raspon) za dužinu repa, intenzitet repa (% DNA) i repni moment izmjerenih u leukocitima periferne krvi izloženih (I) i neizloženih (K) ispitanika prije ozračivanja.

Skupina	Izmjereno kometa	Dužina repa / μ m S.V.±SD med raspon	Intenzitet repa/ % DNA u repu S.V.±SD med raspon	Repni moment S.V.±SD med raspon		
KONTROLNA	4000	14,24±1,89 ^a 14,10 8,97 do 26,92	1,12±2,12 0,24 0,00 do 21,93	0,15±0,27 0,03 0,00 do 2,95		
IZLOŽENA	4000	14,16±2,05 14,10 10,26 do 29,49	1,28±2,27 ^a 0,37 0,00 do 19,42	0,16±0,29 ^a 0,05 0,00 do 2,86		
Gen / Genotip (n/N)						
XRCC1	WT-I (5/20)	1000	14,64±2,01 ^a 14,10 10,90 do 27,56	1,20±2,25 0,33 0,00 do 19,42	0,16±0,30 0,05 0,00-2,86	
			WT-K (6/20)	1200	14,40±1,95 14,10 10,26 do 25,64	1,23±2,21 0,28 0,00 do 16,56
	HE-I SNP-I (15/20)	3000			13,99±2,04 ^b 13,46 10,26 do 29,49	1,31±2,28 ^{a,b} 0,39 0,00 do 16,33
			HE-K SNP-K (14/20)	2400	14,19±1,89 ^a 14,10 8,97 do 26,92	1,07±2,09 0,23 0,00 do 21,93
	MGMT CT	WT-I (10/20)			2000	14,01±1,90 13,46 10,26 do 29,49
			WT-K (12/20)	2400		14,03±1,77 14,10 8,97 do 23,08
HE-I SNP-I (10/20)		1600			14,55±2,01 ^{a,b} 14,10 10,26 do 26,92	1,13±2,24 ^b 0,23 0,00 do 21,93
			HE-K SNP-K (8/20)	2000	14,30±2,18 14,10 10,26 do 28,85	1,21±2,24 ^a 0,32 0,00 do 19,42
hOGG1		WT-I (10/20)			2000	14,43±2,16 ^a 14,10 10,90 do 28,85
			WT-K (13/20)	2400		13,98±1,83 14,10 8,97 do 26,92
	HE-I SNP-I (10/20)	2000			13,88±1,89 ^b 13,46 10,26 do 29,49	1,24±2,22 ^b 0,32 0,00 do 16,33
			HE-K SNP-K (7/20)	1400	14,69±1,91 ^a 14,10 10,26 do 25,64	1,14±2,06 0,33 0,00 do 16,56

a - p<0,05 razlika u istoj podskupini; b - p<0,05 razlika naspram ostale 3 podskupine polimorfno gena; n – broj ispitanika u podskupini; N – ukupni broj ispitanika u skupini; WT-I – podskupina homozigota divljeg tipa u izloženoj skupini; WT-K – podskupina homozigota divljeg tipa u kontrolnoj skupini; HE-I – podskupina heterozigota u izloženoj skupini; SNP-I – podskupina homozigota polimorfno tipa u izloženoj skupini; HE-K – podskupina heterozigota u kontrolnoj skupini; SNP-K – podskupina homozigota polimorfno tipa u kontrolnoj skupini

Tablica 5 Prikaz srednjih vrijednosti sa standardnom devijacijom (S.V.±SD), medijanom (med), minimumom i maksimumom (raspon) za dužinu repa, intenzitet repa i repni moment izmjerenih u leukocitima periferne krvi izloženih (I) i neizloženih (K) ispitanika neposredno nakon ozračivanja s 2 Gy.

Skupina	Izmjereno kometa	Dužina repa / μ m S.V.±SD med raspon	Intenzitet repa/ % DNA u repu S.V.±SD med raspon	Repni moment S.V.±SD med raspon		
KONTROLNA	4000	27,49±8,26 ^a 25,64 13,46 do 72,43	5,59±5,10 4,13 0,00 do 32,89	0,99±0,90 0,74 0,00 do 7,78		
IZLOŽENA	4000	27,43±9,06 25 12,82 do 67,31	6,30±5,20 ^a 4,84 0,00 do 33,96	1,09±0,94 ^a 0,83 0,00 do 9,00		
Gen / Genotip (n/N)						
XRCC1	WT-I (5/20)	1000	24,51±6,95 22,76 14,10 do 55,77	5,16±4,48 3,82 0,00 do 27,19	0,84±0,73 0,62 0,00 do 4,53	
		WT-K (6/20)	1200	24,64±5,75 ^a 23,72 13,46 do 56,41	5,23±5,55 ^a 3,44 0,00 do 32,89	0,87±0,89 0,60 0,00 do 5,71
	HE-I SNP-I (15/20)		3000	28,40±9,46 ^b 26,28 12,82 do 67,31	6,68±5,37 ^{a,b} 5,25 0,00 do 33,96	1,17±0,99 ^{a,b} 0,89 0,00 do 9,00
		HE-K SNP-K (14/20)	2400	28,45±9,00 26,28 13,46 do 72,43	5,61±4,90 4,21 0,00 do 31,62	1,01±0,90 0,76 0,00 do 7,78
	MGMT CT		WT-I (10/20)	2000	25,01±7,74 23,08 12,82 do 56,41	5,60±4,70 ^a 4,36 0,00 do 33,96
		WT-K (12/20)		2400	25,57±6,77 ^a 24,36 13,46 do 56,41	4,79±4,72 3,37 0,00 do 28,97
HE-I SNP-I (10/20)			1600	29,85±9,62 ^{a,b} 27,56 13,46 do 67,31	7,01±5,56 ^{a,b} 5,49 0,00 do 33,35	1,26±1,05 ^{a,b} 0,97 0,00 do 9,00
		HE-K SNP-K (8/20)	2000	26,94±7,96 25 13,46 do 72,43	4,87±4,54 3,51 0,00 do 28,97	0,86±0,81 0,64 0,00 do 7,78
hOGG1			WT-I (10/20)	2000	24,79±7,36 23,08 12,82 do 60,90	5,52±4,42 ^a 4,49 0,00 do 27,19
		WT-K (13/20)		2400	26,94±7,96 ^a 25 13,46 do 72,43	4,87±4,54 3,51 0,00 do 28,97
	HE-I SNP-I (10/20)		2000	30,07±9,80 ^{a,b} 28,20 13,46 do 67,31	7,09±5,77 ^{a,b} 5,36 0,00 do 33,96	1,27±1,08 ^{a,b} 0,93 0,00 do 9,00
		HE-K SNP-K (7/20)	1400	27,56±8,47 25,32 13,46 do 62,82	6,45±5,77 4,70 0,00 do 32,89	1,12±1,00 0,84 0,00 do 7,09

a - p<0,05 razlika u istoj podskupini; b - p<0,05 razlika naspram ostale 3 podskupine polimorfno gena; n - broj ispitanika u podskupini; N - ukupni broj ispitanika u skupini; WT-I - podskupina homozigota divljeg tipa u izloženoj skupini; WT-K - podskupina homozigota divljeg tipa u kontrolnoj skupini; HE-I - podskupina heterozigota u izloženoj skupini; SNP-I - podskupina homozigota polimorfno tipa u izloženoj skupini; HE-K - podskupina heterozigota u kontrolnoj skupini; SNP-K - podskupina homozigota polimorfno tipa u kontrolnoj skupini

Tablica 6 Prikaz srednjih vrijednosti sa standardnom devijacijom (S.V.±SD), medijanom (med), minimumom i maksimumom (raspon) za dužinu repa, intenzitet repa i repni moment izmjerenih u leukocitima periferne krvi izloženih (I) i neizloženih (K) ispitanika 2 sata nakon ozračivanja s 2 Gy.

Skupina	Izmjereno kometa	Dužina repa / μ m S.V.±SD med raspon	Intenzitet repa/ % DNA u repu S.V.±SD med raspon	Repni moment S.V.±SD med raspon		
KONTROLNA	4000	16,75±3,46 16,03 10,90 do 44,23	1,68±2,98 0,44 0,00 do 25,55	0,24±0,43 0,06 0,00 do 3,67		
IZLOŽENA	4000	16,95±3,90 16,03 10,90 do 46,79	1,83±2,86 ^a 0,71 0,00 do 24,99	0,27±0,42 ^a 0,10 0,00 do 3,44		
Gen / Genotip (n/N)						
XRCC1	WT-I (5/20)	1000	15,98±2,50 15,38 11,54 do 26,92	1,22±2,09 0,39 0,00 do 17,20	0,17±0,30 0,06 0,00 do 2,76	
		WT-K (6/20)	1200	17,22±3,19 ^a 16,67 11,54 do 32,05	1,52±2,54 0,41 0,00 do 18,17	0,23±0,38 ^a 0,06 0,00 do 2,68
	HE I SNP-I (15/20)		3000	17,27±4,22 ^{a,b} 16,03 10,90 do 46,79	2,04±3,04 ^{a,b} 0,86 0,00 do 24,99	0,30±0,45 ^{a,b} 0,12 0,00 do 3,44
		HE-K SNP-K (14/20)		2400	16,71±3,72 16,03 10,90 do 44,23	1,67±3,04 0,44 0,00 do 25,55
	MGMT CT		WT-I (10/20)		2000	15,96±2,58 15,38 10,90 do 35,26
		WT-K (12/20)		2400	16,98±3,56 ^a 16,03 10,90 do 33,33	1,66±2,89 0,43 0,00 do 19,97
			HE I SNP-I (10/20)		1600	17,94±4,67 ^{a,b} 16,67 11,54 do 46,79
		HE-K SNP-K (8/20)		2000		16,57±3,47 16,03 10,90 do 42,95
hOGG1			WT-I (10/20)		2000	16,60±3,68 16,03 10,90 do 46,79
		WT-K (13/20)		2400	16,57±3,47 16,03 10,90 do 42,95	1,66±3,08 ^a 0,38 0,00 do 25,55
	HE I SNP-I (10/20)		2000		17,30±4,08 ^{a,b} 16,03 11,54 do 36,54	2,05±3,05 ^{a,b} 0,89 0,00 do 24,99
		HE-K SNP-K (7/20)		1400	17,23±3,51 16,67 11,54 do 44,23	1,58±2,51 0,56 0,00 do 18,17

a - p<0,05 razlika u istoj podskupini; b - p<0,05 razlika naspram ostale 3 podskupine polimorfna gena; n – broj ispitanika u podskupini; N – ukupni broj ispitanika u skupini; WT-I – podskupina homozigota divljeg tipa u izloženoj skupini; WT-K – podskupina homozigota divljeg tipa u kontrolnoj skupini; HE-I – podskupina heterozigota u izloženoj skupini; SNP-I – podskupina homozigota polimorfnog tipa u izloženoj skupini; HE-K – podskupina heterozigota u kontrolnoj skupini; SNP-K – podskupina homozigota polimorfnog tipa u kontrolnoj skupini

popravka u uvjetima *in vitro*. Heterozigoti za isti gen u izloženoj skupini također su pokazivali statistički značajno veća oštećenja u obje promatrane vremenske točke nakon zračenja. Najviše razine primarnih oštećenja DNA prije, neposredno nakon i 120 min nakon zračenja pokazivala je podskupina izloženih ispitanika koji su nositelji jednog ili obaju polimorfnih alela gena *XRCCI* i ta je razlika bila statistički značajna naspram sve tri ostale podskupine (izloženi homozigoti, kontrolni homozigoti i kontrolni nositelji polimorfnog alela) (tablice 4-6).

S obzirom na polimorfizam gena *MGMT*, izloženi ispitanici, nositelji jednog ili obaju polimorfnih alela, imali su statistički značajno više vrijednosti primarnih oštećenja DNA u usporedbi s kontrolom neposredno nakon i 120 min nakon ozračivanja. U usporedbi s ostale tri podskupine (izloženi homozigoti, homozigoti u kontroli te kontrolna skupina s jednim ili oba polimorfna alela) ta je podskupina također pokazivala najviše vrijednosti oštećenja DNA, statistički značajno različite od ostalih podskupina (tablice 4-6).

S obzirom na polimorfizam gena *hOGGI*, izloženi ispitanici nositelji jednog ili obaju polimorfnih alela imali su također statistički značajne razlike naspram odgovarajuće skupine u kontroli neposredno nakon te 120 min nakon zračenja. I ta je skupina imala najveća oštećenja DNA i značajno se statistički razlikovala od ostale tri podskupine prema polimorfizmu u tom genu.

Pri procjeni genotoksičnog učinka doza zračenja koje su ispitanici primili tijekom radnog vijeka, utvrdili smo da su one bile u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa svim parametrima komet testa izmjerenim u DNA leukocita neposredno nakon zračenja dozom od 2 Gy (TL: Spearman $R=-0,51$, $p=0,02$; TI: Spearman $R=-0,42$, $p=0,07$; TM: Spearman $R=-0,50$, $p=0,02$). Ti podaci upućuju da je razina primarnih oštećenja DNA bila značajno niža u ispitanika kojima su tijekom radnog vijeka bile registrirane određene vrijednosti doza, iako su sve te doze bile daleko ispod zakonski dopuštene granice. Drugim riječima, čini se da radna izloženost niskim dozama zračenja "podizlje" aktivnost sustava za popravak DNA na način da su oni nakon akutnog zračenja višom dozom sposobniji učinkovitije popraviti nastala oštećenja.

RASPRAVA

Alkalna izvedba komet-testa omogućuje otkrivanje primarnih oštećenja nastalih nakon izloženosti

nekomu genotoksičnom agensu, a zbog svoje je osjetljivosti vrlo prikladna za praćenje kinetike popravka DNA. Poznato je da se većina primarnih oštećenja u molekuli DNA popravljaju ubrzo nakon nastanka. Prema literaturi, popravak DNA ljudskih limfocita izloženih ionizirajućem zračenju od 2 Gy zbiva se unutar dva sata nakon ozračivanja dozom od 2 Gy (54, 59, 60).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da višegodišnja izloženost niskim dozama ionizirajućeg zračenja utječe na individualnu osjetljivost na zračenje i brzinu popravka DNA. Na uzorcima zračenim dozom od 2 Gy utvrdili smo da važnu ulogu u osjetljivosti nekog ispitanika na zračenje ima ukupna doza koju je on primio u dotadašnjem radnom vijeku, neovisno o tome što je ta doza bila ispod zakonski dopuštene granice. U drugim istraživanjima koja smo također proveli (podaci nisu prikazani) uočeno je da izloženi ispitanici imaju niže razine oštećenja DNA izmjerenih komet-testom tijekom prvih 60 min nakon ozračivanja s 2 Gy, ali to ne vrijedi nakon ozračivanja s 4 Gy (61). Istraživanja pokazuju da razina nastalog oštećenja varira među izloženim pojedincima i slabo korelira s dužinom radnog staža, što upućuje na to da je individualna predispozicija važna u staničnom odgovoru na izloženost zračenju (13, 61).

Naši su rezultati suglasni sa zapažanjima drugih autora (62, 63) koji govore da ponovno izlaganje niskim dozama zračenja može smanjiti razinu nastalog oštećenja u DNA. Naime, niske doze zračenja utječu na pojavu adaptivnog odgovora u prethodno već ozračenih stanica kad se one ponovljeno izlože zračenju drugih doza.

Zbog varijabilnosti u pojedinačnoj osjetljivosti na izloženost zračenju neki autori navode i značajan utjecaj polimorfizma u genima koji sudjeluju u popravku nastalog oštećenja molekule DNA (geni *hOGGI*, *XRCCI* i *XRCC3*) (23). Naši rezultati pokazuju da nosioci jednog ili obaju polimorfnih alela imaju statistički značajno veća oštećenja od homozigotnih pripadnika u cijeloj skupini (izloženih i kontrolnih promatranih zajedno). Uspoređujući kontrolnu i izloženu skupinu, više razine oštećenja zabilježili smo u profesionalno izloženih nositelja, a najviša je izmjerena u nositelja jednog ili obaju polimorfnih alela. Slični se podaci mogu naći i u navodima drugih autora. Dok Aka i suradnici (23) nisu našli nikakav utjecaj gena *hOGGI* na razinu oštećenja, Cornetta i suradnici (64) pokazali su da je nakon ozračivanja stanica dozom od 2 Gy najveće oštećenje primijećeno u uzorcima uzetim od polimorfnog homozigota i heterozigota, što je dokazalo i naše istraživanje. Nositelji jednog

ili obaju polimorfnih alela imaju sporiji kapacitet popravka oštećene DNA (65, 66).

Au i suradnici (67) pokazali su da kombinacija polimorfnih genotipova za gene *XRCC1* i *XRCC3* utječe na porast učestalosti kromosomskih aberacija u limfocitima nakon ozračivanja X-zrakama. Cornetta i suradnici (64) nude objašnjenje da varijantni alel smanjuje učinkovitost popravka te oštećene stanice ulaze u apoptozu. Posljedica je uklanjanje potencijalno transformirane stanice. Prema tome, oni smatraju da su nositelji polimorfnog gena *XRCC1* 399 u prednosti pred nositeljima divljeg tipa toga gena u kojih se nastalo oštećenje popravljiva mehanizmima koji dovode do zadržavanja nastalih mutacija, što može rezultirati pojavom klonskih bolesti. Uzmemo li se u obzir prednosti popravka i prednosti uništavanja oštećene stanice mehanizmom apoptoze, takav zaključak otvara prostor za raspravu jer je u slučaju preživljenja stanice prednost dobar popravak, a u slučaju fiksiranja mutacija i zloćudne preobrazbe cilj je ukloniti stanice s prevelikom količinom štetnih mutacija.

Dok Cornetta i suradnici (64) nisu našli poveznicu između rezidualnog oštećenja u DNA i genotipa *hOGG1* Aka i suradnici (67) pokazali su da je polimorfizam *OGG1* Ser326Cys povezan sa smanjenim kapacitetom popravka oksidativnih oštećenja.

Osjetljivost na zračenje može biti posljedica kombiniranog učinka polimorfizama u genima za popravak i drugih gena čije su transkripcijske razine znatno promijenjene u odgovoru na izloženost zračenju (68).

Treći gen koji smo istraživali je *MGMT* koji se dovodi u vezu sa zloćudnim tumorima mozga te se smatra predominantnim rizičnim čimbenikom nastanka glioma (69, 70). Istražujući pojavnost glioma i vezu s ionizirajućim zračenjem, Liu (71) pokazao je da je polimorfizam u genu *MGMT* F84L odgovoran za nastanak navedenog tumora. Polimorfizam istoga gena dovodi se i u vezu s povećanim rizikom od raka endometrija (72). Naše je istraživanje također pokazalo da su u leukocitima nositelja polimorfnog gena *MGMT* iz izložene skupine nakon ozračivanja s pomoću komet-testa izmjerene najviše vrijednosti oštećenja DNA, pokazujući tako povezanost polimorfizma u ovom genu i veću osjetljivost na zračenje.

Većina do sada provedenih istraživanja polimorfizama gena odnosila se na utvrđivanje njihova značenja kao čimbenika rizika od razvoja određenih zloćudnih bolesti koje su jedan od najvećih epidemioloških problema. Istraživanja učinaka izloženosti različitim mutagenima iz radnog okoliša uglavnom se pokušavaju

dovesti u vezu s epidemiologijom zloćudnih bolesti. Posebna pozornost posvećuje se fizikalnim i/ili kemijskim mutagenima koji pridonose nastanku oštećenja u genomu radno izloženih populacija.

Kombinacija komet-testa, kao metode koja omogućuje procjenu razina primarnih oštećenja u DNA nastalih izlaganjem ionizirajućem zračenju, i utvrđivanja stupnja polimorfizma pojedinih gena koji sudjeluju u popravku mogla bi dati odgovor na pitanje jesu li nositelji kombinacija pojedinih polimorfnih gena prirodno osjetljiviji na zračenje, pa bi zbog smanjenog kapaciteta za popravak DNA tijekom života trebali izbjegavati dodatne radne izloženosti ionizirajućem zračenju s kojima bi mogli doći u kontakt tijekom radnog procesa.

Istraživanje uloge polimorfizama pojedinih gena za popravak oštećenja DNA značajno mijenja stav o učincima niskih doza zračenja na radno izložene populacije. Spoznaje o genski uvjetovanim interindividualnim razlikama u osjetljivosti i njihovo razumijevanje mogli bi naći primjenu u zdravstvenom nadzoru kako osoba radno izloženih zračenju tako i pri izlaganju zračenju u dijagnostičke i terapijske svrhe.

ZAKLJUČAK

Potvrđena je vrijednost alkalnoga komet-testa kao jednostavne, brze i osjetljive metode otkrivanja i mjerenja razine primarnih oštećenja DNA koja su u leukocitima periferne krvi kontrolnih i radno izloženih ispitanika postojale prije ili su potaknuta izlaganjem ionizirajućem zračenju. Višegodišnja radna izloženost ispitanika niskim dozama ionizirajućeg zračenja značajno je utjecala na razinu oštećenja i brzinu popravka DNA. Dokazano je da učinci zračenja ovise o genskoj predispoziciji svakog pojedinca. U nositelja jednog ili obaju polimorfnih alela gena *XRCC1*, *MGMT* i *hOGG1* opažen je manji kapacitet popravka nakon ozračivanja. Rezultati upućuju na vrijednost primjene alkalnoga komet-testa i genotipizacije izloženih pojedinaca u genima za popravak, što bi moglo pridonijeti prepoznavanju subpopulacija sklonijih nakupljanju oštećenja, a time i sklonijih riziku od razvoja tumorskih bolesti.

LITERATURA

1. Jeggo P, Lavin MF. Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? *Int J Radiat Biol* 2009;85:1061-81.

2. Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
3. Berwick M, Vineis P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:874-97.
4. Roos WP, Binder A, Böhm L. Determination of the initial DNA damage and residual DNA damage remaining after 12 hours of repair in eleven cell lines at low doses of irradiation. *Int J Radiat Biol* 2000;76:1493-500.
5. Barquintero JF, Barrios L, Caballin MR, Miro R, Ribas M, Subias A, Egozcue J. Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res* 1993;286:275-79.
6. Paz-y-Mino C, Leone PE, Chavez M, Bustamante G, Cordova A, Gutierrez S, Penaherrera MS, Sanchez ME. Follow up study of chromosome aberrations in lymphocytes in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res* 1995;335:245-51.
7. Maluf SW, Passos DF, Bacelar A, Speit G, Erdtmann B. Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to X-radiation using the micronucleus test and the comet assay. *Environ Mol Mutagen* 2001;38:311-15.
8. Rozgaj R, Kasuba V, Sentija K, Prlic I. Radiation-induced chromosomal aberrations and haematological alterations in hospital workers. *Occup Med* 1999;49:353-60.
9. Zakeri F, Assaei RG. Cytogenetic monitoring of personnel working in angiocardiology laboratories in Iran hospitals. *Mutat Res* 2004;562:1-9.
10. Maffei F, Angelini S, Forti GC, Violante FS, Lodi V, Mattioli S, Hrelia P. Spectrum of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of hospital workers occupationally exposed to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res* 2004;547:91-9.
11. Sari-Minodier I, Orsière T, Auquier P, Martin F, Botta A. Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res* 2007;629:111-21.
12. Andreassi MG, Cioppa A, Botto N, Joksic G, Manfredi S, Federici C, Ostojic M, Rubino P, Picano E. Somatic DNA damage in interventional cardiologists: a case-control study. *FASEB J* 2005;19:998-9.
13. Andreassi MG, Foffaa I, Manfredi S, Botto N, Cioppa A, Picano E. Genetic polymorphisms in XRCC1, OGG1, APE1 and XRCC3 DNA repair genes, ionizing radiation exposure and chromosomal DNA damage in interventional cardiologists. *Mutat Res* 2009;666:57-63.
14. Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005;162:925-42.
15. Weiss JM, Goode EL, Ladiges WC, Ulrich CM. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinog* 2005;42:127-41.
16. Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1810-8.
17. Kotsopoulos J, Chen Z, Vallis KA, Poll A, Ainsworth P, Narod SA. DNA repair capacity as a possible biomarker of breast cancer risk in female BRCA1 mutation carriers. *Br J Cancer* 2007;96:118-25.
18. Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* 2005;221:123-9.
19. Mohrenweiser HW, Wilson DM, Jones IM. Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. *Mutat Res* 2003;526:93-125.
20. Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett* 2004;149:309-34.
21. Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 2001;22:917-22.
22. Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 2000;21:551-5.
23. Aka P, Mateuca R, Buchet JP, Thierens H, Kirsch-Volders M. Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat Res* 2004;556:169-81.
24. Touil N, Aka PV, Buchet JP, H. Thierens, M. Kirsch-Volders, Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionizing radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagenesis* 2002;17:223-32.
25. Caldecott KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair* 2003;2:955-69.
26. Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005;162:925-42.
27. Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1810-8.
28. Sliwinski T, Ziemia P, Morawiec Z, Kowalski M, Zadrozny M, Blasiak J. Polymorphisms of the DNA polymerase β gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007;103:161-6.
29. Figueroa JD, Malats N, Real FX, Silverman D, Kogevinas M, Chanock S, Welch R, Dosemeci M, Tardón A, Serra C, Carrato A, Garcia-Closas R, Castaño-Vinyals G, Rothman N, Garcia-Closas M. Genetic variation in the base excision repair pathway and bladder cancer risk. *Hum Genet* 2007;121:233-42.
30. Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, Strom SS, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and the neck. *Carcinogenesis* 1999;20:2125-9.
31. Stern MC, Umbach DM, van Gils CH, Lunn RM, Taylor JA. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:125-31.
32. Divine KK, Gilland FD, Crowell RE, Stidley CA, Bocklage TJ, Cook DL, Belinsky SA. The XRCC1 glutamine 399 allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat Res* 2001;416:273-8.
33. Wang LE, Bondy ML, Shen H, El-Zein R, Aldape K, Cao Y, Pudavalli V, Levin VA, Yung WKA, Wei Q. Polymorphisms of DNA repair gene and risk of glioma. *Cancer Res* 2004;64:5560-3.
34. Lu T, Nash HM, Verdine GL. A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr Biol* 1997;7:397-407.
35. Yokoyama S, Yamakawa K, Tsuchiya E, Murata M, Sakiyama S, Nakamura Y. Deletion mapping on the short

- arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* 1992;52:873-7.
36. Sunaga N, Kohno T, Yanagitani N, Sugimura H, Kunitoh H, Tamura T, Takei Y, Tsuchiya S, Saito R, Yokota J. Contribution of the NQO1 and GSTT1 polymorphisms to lung adenocarcinoma susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:730-8.
 37. Ito H, Hamajima N, Takezaki T, Matsuo K, Tajima K, Hatooka S, Mitsudomi T, Suyama M, Sato S, Ueda R. A limited association of OGG1 Ser326Cys polymorphism for adenocarcinoma of the lung. *J Epidemiol* 2002;12:258-65.
 38. Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair* 2007;6:1155-60.
 39. Kaur TB, Travaline JM, Gaughan JP, Richie JP Jr, Stellman SD, Lazarus P. Role of polymorphisms in codons 143 and 160 of the O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase gene in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:339-42.
 40. Krzesniak M, Butkiewicz D, Samojedny A, Chorazy M, Rusin M. Polymorphisms in TDG and MGMT genes - epidemiological and functional study in lung cancer patients from Poland. *Ann Hum Genet* 2004;68:300-12.
 41. Chae MH, Jang J-S, Kang H-G, Park JH, Park JM, Lee WK, Kam S, Lee EB, Son J-W, Park JY. O⁶-Alkylguanine alkyltransferase gene polymorphisms and the risk of primary lung cancer. *Mol Carcinogen* 2006;45:239-49.
 42. Cohet C, Borel S, Nyberg F, Mukeria A, Bruske-Hohlfeld I, Constantinescu V, Benhamou S, Brennan P, Hall J, Boffetta P. Exon 5 polymorphisms in the O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase gene and lung cancer risk in non-smokers exposed to second-hand smoke. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:320-3.
 43. Yang M, Coles BF, Caporaso NE, Choi Y, Lang NP, Kadlubar FF. Lack of association between Caucasian lung cancer risk and O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase-codon 178 genetic polymorphism. *Lung Cancer* 2004;44:281-6.
 44. Olive PL. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol* 1999;75:395-405.
 45. Mayer C, Popanda O, Zelezny O, von Brevern MC, Bach A, Bartsch H, Schmezer P. DNA repair capacity after gamma-irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes. *DNA Repair* 2002;1:237-50.
 46. Singh NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res* 2000;455:111-27.
 47. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206-21.
 48. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004;26:249-61.
 49. Albertini RJ, Nicklas JA, O'Neill JP. Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ Health Perspect* 1996;104(Suppl 3):503-10.
 50. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider LL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-91.
 51. Gamulin M, Garaj-Vrhovac V, Kopjar N. Evaluation of DNA damage in radiotherapy-treated cancer patients using the alkaline comet assay. *Coll Antropol* 2007;31:837-45.
 52. Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DN damage in individual cells. U: Witmer CM, Snyder RR, Hollow DJ, Kalf GF, Kocsis JJ, Sipes JG, urednici. Biological reactive intermediates, IV Molecular and cellular effects and their impact on human health. New York (NY): Plenum Press; 1990. str. 157-64.
 53. Price A. The repair of ionising radiation- induced damage to DNA. *Cancer Biol* 1993;4:61-71.
 54. Tice RR. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. U: Phillis DH, Venitt S, urednici. Environmental Mutagenesis. Oxford: Bioscientific; 1995. str. 315-39.
 55. Daly AK, Steen VM, Fairbrother KS, Idle JR. CYP2D6 multiallelism. *Meth Enzymol* 1996;272:199-210.
 56. Osgood-McWeeney D, Galluzzi JR, Ordovas JM. Allelic discrimination for single nucleotide polymorphisms in the human scavenger receptor class B type 1 gene locus using fluorescent probes. *Clin Chem* 2000;46:118-9.
 57. Angelini S, Kumar R, Carbone F, Maffei F, Forti GC, Violante FS, Lodi V, Curti S, Hemminki K, Hrelia P. Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. *Mutat Res* 2005;570:105-17.
 58. Godderis L, Aka P, Mateuca R, Kirsch-Volders M, Lison D, Veulemans H. Dose-dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation. *Toxicology* 2006;219:220-9.
 59. Plappert UG, Stocker B, Fender H, Flidner TM. Changes in the repair capacity of blood cells as a biomarker for chronic low-dose exposure to ionizing radiation. *Environ Mol Mutagen* 1997;30:153-60.
 60. Olive PL, Frazer G, Banath JP. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res* 1993;136:130-6.
 61. Milić M. Važnost individualne osjetljivosti za procjenu rizika od oštećenja genoma pri kroničnoj profesionalnoj izloženosti niskim dozama ionizirajućeg zračenja [d disertacija]. Zagreb: Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; 2010.
 62. Ikushima T, Aritomi H, Moristita J. Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat Res* 1996;358:193-8.
 63. Wolff S. Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents. *Mutat Res* 1996;358:135-42.
 64. Cornetta T, Festa F, Testa A, Cozzi R. DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66:537-45.
 65. Au WW. Heritable susceptibility factors for the development of cancer. *J Radiat Res* 2006;47B:13-7.
 66. Mateuca RA, Roelants M, Iarmarcovai G, Aka PV, Godderis L, Tremp A, Bonassi S, Fenech M, Bergé-Lefranc JL, Kirsch-Volders M. hOGG1(326), XRCC1(399) and XRCC3(241) polymorphisms influence micronucleus frequencies in human lymphocytes *in vivo*. *Mutagenesis* 2008;23:35-41.
 67. Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH. Functional characterization of polymorphism in DNA repair genes

- using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect* 2003;111:1843-9.
68. Rieger KE, Hong WJ, Tusher VG, Tang J, Tibshirani R, Chu G. Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;10:6635-40.
69. Felini MJ, Olshan AF, Schroeder JC, North KE, Carozza SE, Kelsey KT, Liu M, Rice T, Wiencke JK, Wrensch MR. DNA repair polymorphisms XRCC1 and MGMT and risk of adult gliomas. *Neuroepidemiology* 2007;29:55-8.
70. Inoue R, Isono M, Abe M, Abe T, Kobayashi H. A genotype of the polymorphic DNA repair gene MGMT is associated with de novo glioblastoma. *Neuro Res* 2003;25:875-9.
71. Liu Y, Scheurer ME, El-Zein R, Cao Y, Do KA, Gilbert M, Aldape KD, Wei Q, Etzel C, Bondy ML. Association and interactions between DNA repair gene polymorphisms and adult glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:204-14.
72. Huang J, Ye F, Chen H, Lu W, Xie X. Amino acid substitution polymorphisms of the DNA repair gene MGMT and the susceptibility to cervical carcinoma. *Carcinogenesis* 2007;28:1314-22.

Summary

DNA REPAIR GENE POLYMORPHISMS AND SENSITIVITY TO IONISING RADIATION

Increasing exposure to ionising radiation raises a great concern about potential DNA damage in occupationally exposed individuals. Polymorphisms of DNA repair genes can determine individual sensitivity and DNA damage response to low doses of ionising radiation. The objective of this study was to assess DNA damage in leukocytes at baseline, immediately after and 120 min after exposure to gamma-radiation of 2 Gy, to compare DNA damage between the control group of subjects and subjects occupationally exposed to low-dose gamma-radiation, and to determine the relationship between *hOGG1* (8-oxoG specific DNA glycosylase/AP-Lyase, Ser326Cys), *XRCC1* (*X-ray repair cross-complementing protein-group 1*, Arg194Trp), and *MGMT* (O6-methylguanine-DNA methyltransferase, Leu84Phe) gene and DNA damage. The study enrolled 40 healthy subjects (20 controls and 20 occupationally exposed subjects), whose leukocytes were exposed to ionising radiation and tested for DNA damage (tail length, percentage of DNA in comet tail, and tail moment) using the alkaline version of the comet assay. Our results show that tail DNA percentage and tail moment were significantly higher in the exposed group at baseline, immediately after, and 120 min after exposure to 2 Gy. The exposed subjects carrying polymorphic alleles had significantly higher DNA damage than homozygous carriers of the same gene and controls. Combined use of the alkaline comet assay and genotyping of DNA repair genes could help discover sensitive occupationally exposed individuals who can accumulate higher DNA damage and are at higher risk of developing tumours.

KEY WORDS: *comet assay, DNA damage, hOGG1, genotyping, XRCC1, MGMT*

CORRESPONDING AUTHOR:

Mirta Milić
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2, 10000 Zagreb
E-mail: mmilic@imi.hr